

## Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne

Die Erfindung betrifft ein Protein, das spezifisch an die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne bindet.

Fibronektine sind eine wichtige Klasse von Matrix-Glykoproteinen. Ihre Hauptrolle besteht darin, das Anhaften von Zellen an eine Vielzahl verschiedener extrazellulärer Matrices zu ermöglichen. Das Vorhandensein von Fibronektinen auf der Oberfläche von nicht-transformierten Zellen in Kultur sowie deren Abwesenheit bei transformierten Zellen führte zur Identifizierung von Fibronektinen als wichtigen Adhäsionsproteinen. Sie wechselwirken mit zahlreichen verschiedenen anderen Molekülen, z. B. Collagen, Heparansulfat-Proteoglykanen und Fibrin, und regulieren damit die Zellform und den Aufbau des Zytoskeletts. Weiterhin sind sie verantwortlich für Zellmigration und Zelldifferenzierung während der Embryogenese. Sie sind außerdem wichtig für die Wundheilung, bei der sie die Wanderung von Makrophagen und anderen Immunzellen in das betroffene Gebiet ermöglichen, und bei der Bildung von Blutgerinnseln, indem sie das Anheften von Blutplättchen an beschädigte Regionen der Blutgefäße ermöglichen.

Fibronektine sind Dimere zweier ähnlicher Peptide, wobei jede Kette ungefähr 60 - 70 nm lang ist. Wenigstens 20 verschiedene Fibronektin-Ketten sind identifiziert worden, von denen alle durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts eines einzelnen Fibronektin-Gens erzeugt werden. Eine Analyse von proteolytischen Verdauen von Fibronektin zeigt, daß die Polypeptide aus sechs stark gefalteten Domänen bestehen, von denen jede Domäne wiederum sog. Wiederholungssequenzen („repeats“) enthält, deren Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz eine Klassifikation in drei Typen erlauben (Typ I, II, III). Die zentrale Region beider Ketten aus dem Dimer besteht aus einem Abschnitt von sog. Typ-III-Wiederholungen, die durchschnittlich 90 Aminosäuren lang sind (Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K und Baralle FE, 1983. Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 3218-22). Strukturelle Studien haben ergeben, daß jede Typ-III-Wiederholung aus sieben beta-Strängen besteht, die in zwei antiparallele Faltblätter gefaltet sind, wobei kur-

ze Loop-Regionen als potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungsstellen exponiert sind (Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I und Erickson HP. 1992. Structure of fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*, 258, 987-91). Diese Wiederholungen vom Typ III ermöglichen es, daß Fibronektine als Adhäsionsmoleküle fungieren, die mit Zelloberflächenmolekülen, den so. "Integrinen" interagieren. Der Begriff des Integrins wurde 1987 erstmals in einem Übersichtsartikel (Hynes R.O., 1987, *Cell* 48, 549-550) verwendet, um eine verwandte Gruppe von heterodimeren Zelloberflächenmolekülen zu beschreiben, die als Vermittler zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Cytoskelett fungieren und so die Zelladhäsion und Migration induzieren. Diese heterodimeren Rezeptoren „integrieren“, oder vermitteln also Signale vom extrazellulären Milieu mit spezifischen zellulären Funktionen. Bis heute sind 17 beta-Untereinheiten bekannt, die mit mehr als 20 alpha-Untereinheiten spezifisch und nicht-kovalent interagieren können, um so mehr als 20 verschiedene Familien zu bilden (Plow E. F. et al. 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). Insbesondere vermittelt die Sequenz RGDS, die sich in der zehnten Wiederholung vom Typ III des Fibronektins befindet (III-10), die Wechselwirkung von Fibronektin mit wenigstens 8 verschiedenen Integrinen. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß mindestens vier Integrine in einer RGDS-unabhängigen Weise spezifisch mit Fibronektin interagieren können (Plow E. F. et al. 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). Die Gruppe der Wiederholungssequenzen vom Typ III umfaßt neben den III7-, III8-, III9- und III10-Sequenzen auch die Repeats EIIIB und EIIIA (ED<sub>b</sub> und ED<sub>a</sub>). Die Funktionen dieser beiden Wiederholungssequenzen sind bislang nicht oder nur zu einem geringen Maße verstanden. Eine Studie von Jarnagin W. et al. (Jarnagin W. Rockey D. Kotliansky V. Wang S. und Bissell D. 1994, Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*, 127, 2037-48) legt nahe, daß die ED<sub>a</sub>-Domäne bei einer frühen Antwort der Leber auf eine Verletzung beteiligt ist, und weiterhin scheint die ED<sub>a</sub>-Domäne beim Vermitteln von Zelladhäsionsvorgängen beteiligt zu sein. Eine Fibronektin-Isoform, die die ED<sub>b</sub>-Sequenz (ED<sub>b</sub>-FN oder ED-B oder EDB) enthält, ist in normalem Erwachsenengewebe nicht nachweisbar, zeigt jedoch eine starke Expression in fötalem Gewebe sowie Tumorgewebe, ebenso wie auch während der Wundheilung.

Während der Entwicklung eines Tumors wird die extrazelluläre Matrix des Gewebes, in dem der Tumor wächst, durch proteolytischen Abbau bereits existierender Matrix-Bestandteile umgebaut. Hierbei entsteht eine tumorinduzierte extrazelluläre Matrix, die sich von der von normalen Geweben unterscheidet, eine geeignetere Umgebung für das Tumorwachstum bietet und die Angiogenese fördert. Angiogenese ist einer der wichtigsten Vorgänge beim Tumorwachstum und bezeichnet den Prozeß, bei dem neue Gefäße aus existierenden Endothel-beschichteten Gefäßen hervorgehen. Angiogenese ist ein invasiver Prozeß, der eine Proteolyse der extrazellulären Matrix, Proliferation, gerichtete Wanderung und Differenzierung von Endothelzellen in neue Kapillaren erfordert, die das Wachstum eines Tumors über eine bestimmte Größe hinaus unterstützen.

ED<sub>b</sub>-Fibronektin ist mit dem Tumorwachstum in Verbindung gebracht worden. Weiterhin ist ED<sub>b</sub>-FN um neue Blutgefäße während angiogener Vorgänge angereichert und stellt somit einen Marker für die Angiogenese bereit (Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L (1994) Int. J. Cancer 59:612-618).

Die ED<sub>b</sub>-Domäne ist eine Wiederholungssequenz vom Typ III, umfassend 91 Aminosäuren, und weist eine extrem hohe Sequenzhomologie zwischen dem Ratten- und Hühner-Fibronektin auf, die zwischen 96 % und 100 % liegt. Innerhalb der Domäne kommen keine RGDS- oder andere Aminosäuresequenzen vor, von denen bekannt ist, daß sie eine Interaktion mit Integrinen vermitteln. Die genaue Funktion der ED-B -Domäne ist bis dato unbekannt. Drei Studien sind veröffentlicht worden, die Spekulationen über eine allgemeine fördernde Funktion hinsichtlich Adhäsion/Zellausbreitung für verschiedene Zellen anstellen.

Chen und Culp (1996), Exp. Cells Res. 223, 9-19, haben gezeigt, daß zelluläre Fibronektine die ED<sub>b</sub>-Domäne und benachbarte Wiederholungssequenzen vom Typ III als u. U. adhäsionsfördernde Sequenzen enthalten, die von den Zellen durch alternatives Spleißen des primären Transkripts von Fibronektin reguliert werden können.

In einer späteren Studie (Chen und Culp, 1998, Clin. Exp. Metast., 16, 1, 30-42) konnte gezeigt werden, daß ED<sub>b</sub> Zell-Signal-Ereignisse induziert, die zu einer Ty-

rosin-Phosphorylierung von fokalen Adhäsionsproteinen führt, und zwar mit einem Mechanismus, der sich von demjenigen unterscheidet, der durch die Wiederholungssequenzen III8-9-10 vermittelt wird, welche Integrine erkennen. Es wird zunehmend anerkannt, daß die Zelladhäsion an extrazelluläre Matrices bzw. an andere Zellen eine wichtige Quelle für Zell-Signale ist, die für die Regulation vieler Phänomene verantwortlich ist, wie z. B. Zellwachstum, -differenzierung und -transformation. Ein Adhäsions-induziertes Signalgeben beinhaltet die Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen und eine Kaskade der Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Signal-Moleküle. Die Autoren der eben genannten Studie weisen darauf hin, daß für diesen Signalprozeß die 125 kDa fokale Adhäsionskinase (FAK) von zentraler Bedeutung ist, die die Zell-Wechselwirkung mit Matrix-Proteinen an die Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen verknüpft, wie etwa Src (Xing Z, Chen HC, Nowlen JK, Taylor SJ, Shalloway D und Guan JL, 1994, Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol Biol Cell.* **5**, 413-21), Grb2 (Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T und van der Geer P, 1994, Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**, 786-91) und PI-3-Kinase (Chen HC und Guan JL, 1994, Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 10148-52). Von einem anderen fokalen Adhäsionsprotein p130cas wird ebenso angenommen, daß es bei Adhäsions-vermittelten Signalereignissen und bei spezifischen Onkogen-Aktivitäten beteiligt ist, obwohl seine genaue Funktion bisher nicht aufgeklärt ist (Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, *et al.* 1994, A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes *in vivo* with v-Crk and c-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* **13**, 3748-56; Petch LA, Bockholt SM, Bouton A, Parsons JT und Burridge K, 1995, Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 SRC substrate. *J Cell Sci*, **108**, 1371-9; Polte TR und Hanks SK, 1995, Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130<sup>Cas</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 10678-82).

Die Studie von Chen und Culp (1998, aaO) zeigt, daß das Mono-Wiederholungs-Protein ED<sub>b</sub> stärker fördernd war für die Ausbreitung von Balb/c 3T3-Zellen sowie für das Induzieren von FAK-Tyrosin-Phosphorylierung als die benachbarten Repeats III8 etc.. Es wird die Vermutung angestellt, daß bei physiologischen Kon-

zentrationen der zellulären Fibronectine die Bindung des Tetrapeptids RGDS aus III10 an die Integrine möglicherweise ein nicht hinreichend starkes Signal für die Zelladhäsion erzeugt, so daß es bei dem durch die Wechselwirkung zwischen III10 und Integrin-vermittelten Mechanismen zu keiner Tyrosin-Phosphorylierungs-

5 Antwort kommt. Es wird weiter vermutet, daß der Unterschied hinsichtlich der Antwort auf die unterschiedlichen vermittelten Zelladhäsionen durch eine unterschiedliche Aktivierung verschiedener kleiner GTP-bindender Proteine verursacht wird. Drei dieser Proteine, cdc42, rac und rho, die alle Mitglieder der ras-Superfamilie sind, spielen wichtige Rollen bei zell-morphologischen Veränderungen.

10 cdc42 agiert sequenziell stromaufwärts von rac und induziert direkt das Erscheinen von Filopodien (Nobes CD und Hall A, 1995, Rho, rac, und cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*. **81**, 53-62). Die Aktivierung von rac ist dann verantwortlich für die Bildung von Lamellipodien und das Netzwerk von Aktin-Filamenten zwischen den Filopodien. Weiter stromabwärts rho kann durch rac aktiviert werden und induziert fokale Adhäsionen und Aktin-Zugfasern. Alle diese Ereignisse sind abhängig von der Aktivierung von Tyrosin-Kinase, und von FAK wird angenommen, daß sie bei diesen Vorgängen beteiligt ist. Chen und Culp

15 stellen die Vermutung an, daß die morphologischen Unterschiede zwischen Zellen, die über 7-ED<sub>b</sub>-8 adhären sind, sowie Zellen, die über 8-9-10 adhären sind, auf der unterschiedlichen Aktivierung der kleinen GTP-bindenden Proteine beruht. Daraus wird gefolgert, daß eine Adhäsion über 8-9-10 über den Integrin-vermittelten Signalweg schließlich zu einer Aktivierung von rho führt, um fokale Adhäsionen und Aktin-Zugfasern zu erzeugen, während die Adhäsion von Balb/c-

20 3T3-Zellen über 7-ED<sub>b</sub>-8 nur zu einer Aktivierung von cdc42- und rac-Proteinen führt, nicht jedoch rho aktiviert. Für die eben genannten Mutmaßungen werden jedoch in keiner der beiden Studien Daten präsentiert.

Eine andere Studie (Hashimoto-Uoshima et al., 1997, *J. Cell Sci.* **110**, 2271-2280) zeigt, daß die Zell-Adhäsion von kultivierten Fibroblasten durch die Anwesenheit

30 von Fibronectin-Fragmenten, die die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne einschließen, verstärkt wird. Daraus wird gefolgert, daß die gespleißte ED<sub>b</sub>-Domäne eine wichtige biologische Funktion hinsichtlich der Verstärkung der Zell-Adhäsion und -ausbreitung haben kann. Demgegenüber verhindert der Einschluß von ED<sub>a</sub> in

Fragmenten in Abwesenheit von ED<sub>b</sub> die Ausbildung von guten fokalen Adhäsionen in Zellen. Darauf basierend, spekulieren die Autoren dieser Studie, daß der Einschluß beider Domänen im Fibronectin-Molekül einen Mechanismus darstellen kann, mit dem eine Zell-Adhäsion in dem Ausmaße erreicht wird, daß Fortbewegungsvorgänge erleichtert werden, bei denen sowohl Adhäsion als auch Verluste der Adhäsion für das Fortbewegen von Zellen benötigt wird.

Untersuchungen an Hühnerembryonen und erwachsenen Mäusen zeigten, daß ED<sub>b</sub>-vermittelte Angiogenese durch Inhibition des Endothelzell-Integrins  $\alpha 3 \beta 1$  blockiert werden kann (Renato et al., AACR 2001, LB-60).

Keine der genannten Studien und Untersuchungen ergibt jedoch eine klare Antwort hinsichtlich der Funktion der ED<sub>b</sub>-Domäne, noch werden Aussagen getroffen über die Identität eines möglichen (möglicher) Rezeptors (Rezeptoren) für die ED<sub>b</sub>-Domäne.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Funktion der ED<sub>b</sub>-Domäne weiter aufzuklären. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen möglichen spezifischen Rezeptor für die ED<sub>b</sub>-Domäne zu identifizieren. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den ED<sub>b</sub>-spezifischen Adhäsions-Mechanismus und die Wechselwirkung mit Rezeptormolekülen aufzuklären, die beim Prozeß der Angiogenese beteiligt sein könnten. Weiterhin ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die für die spezifische Bindung verantwortliche ED<sub>b</sub>-Region zu identifizieren.

Diese Aufgabe wird gelöst durch

ein Protein,

a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne zu binden;

b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

- c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;
- d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- e) dessen Bindung an die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird; und

- 5 f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

Insbesondere bevorzugt ist ein Protein,

- 10 a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne zu binden, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt;

b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;

d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;

- 15 e) dessen Bindung an die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt; und

f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

Ganz besonders bevorzugt ist ein Protein,

5 a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne zu binden, und das die  $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt;

b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;

d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;

10 e) dessen Bindung an die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, und das die  $\alpha$ -Kette des Integrins umfaßt; und

f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Endothelzellen proliferierende Endothelzellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die stromalen Zellen Tumor-Stroma-Zellen.



Die Aufgabe wird außerdem gelöst durch ein Protein, dessen spezifische Bindung an die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne die Adhäsion von Endothelzellen, Tumor-Stroma-Zellen und Tumorzellen vermittelt. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die

5 SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die  $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Die Aufgabe wird auch durch ein Protein gelöst, dessen spezifische Bindung an die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne die Proliferation von Endothelzellen induziert. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die  $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch ein Protein, dessen spezifische Bindung an die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in eine Collagenmatrix induziert, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die  $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch ein Protein, das an die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne bindet und spezifische Signaltransduktionswege induziert, wobei mindestens ein Gen induziert wird, das für ein Protein codiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die

Fokale Adhäsionskinase,

CD6-Ligand (ALCAM),

die  $\alpha$ -Kette des Vitronektin-Rezeptors,

die integrierte alpha 8 Untereinheit und

einen/den Vorläufer für Follistatin-verwandtes Protein

umfaßt.

- 5 Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die  $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Es wird bevorzugt, daß bei der Induktion spezifischer Signaltransduktionswege mindestens eines der genannten Gene mindestens einfach induziert wird. Bevorzugter wird dabei mindestens eines der genannten Gene zweifach induziert.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch einen Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung zu binden.

- Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch einen Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein zu binden, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4 umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper in der Lage, Effekte zu inhibieren, die für die ED<sub>b</sub>-Domäne spezifisch sind.

Es wird bevorzugt, daß die Bindung und Inhibierung in vitro und/oder in vivo erfolgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper monoklonal oder rekombinant.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper ein scFv-Fragment.

5 Die Aufgabe wird auch gelöst durch eine Zelle, die ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch eine Zelle, die einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

Außerdem wird die Aufgabe durch einen Phagen gelöst, der einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

10 Die Aufgabe wird auch gelöst durch ein Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne binden, wobei das Verfahren umfaßt:

15 Vergleich einer Antwort von Zellen in Anwesenheit von einer oder mehrerer dieser Verbindungen mit der Kontrollantwort besagter Zellen in Abwesenheit dieser Verbindungen, wobei die Zellen

ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimieren oder

eine Nukleinsäure, die für dieses Protein codiert, umfassen, und

wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort durch einen Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne vermittelt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen, die mit der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfaßt eine Bindungsregion der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne die Sequenzen SEQ ID NO:1 - 4 oder Teile davon.

Es wird bevorzugt, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix, die mit der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.

- 15 Es ist bevorzugt, daß die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, Antikörperfragmente, artifizielle Antikörper, Peptide, niedermolekulare Verbindungen, Aptamere und Spiegelmere umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper rekombinante Antikörper.

Es wird bevorzugt, daß die Antikörper ausgewählt sind aus der Gruppe, die scFv und Fragmente davon umfaßt.

- 20 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch ein Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne binden, wobei das Verfahren umfaßt:

a) In-Kontakt-Bringen von Zellen mit einer festgelegten Konzentration eines Proteins, das die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von einer oder mehrerer der Verbindungen; und

- 5 b) Nachweisen von Unterschieden in der Antwort der Zellen auf das Protein, das die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit der Verbindungen im Vergleich mit der Kontrollantwort der Zellen auf das Protein, das die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Abwesenheit dieser Verbindungen, wobei

die Zellen ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimieren oder

eine Nukleinsäure, die für dieses Protein codiert, umfassen, und

wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort durch einen Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne vermittelt wird.

- 15 Dabei ist bevorzugt, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

Monoklonale Antikörper wurden mittels Standard-Methoden der Hybridomatechnologie hergestellt und immunhistologisch auf humanem Tumor-Cryoschnitten charakterisiert (s. Fig.13).

Exemplarisch: AK AM-EDBr-2 (murines IgG 1/kappa)

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen, die mit der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix, die mit der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.

10 Es ist bevorzugt, daß die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, artifizielle Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide, niedermolekulare Substanzen, Aptamere und Spiegelaptamere umfaßt.

15 Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne oder die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne binden.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch die Verwendung eines Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung bzw. eines Antikörpers gemäß der vorliegenden Erfindung zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne oder die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne binden.

20 Ebenso gelöst wird die Aufgabe durch die Verwendung einer Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne oder die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne binden.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe,

die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

- 5 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke. Unter therapeutischem Zweck ist u. a. die anti-angiogene Behandlung mit Verbindungen, die die spezifische Interaktion zwischen ED<sub>b</sub> und dem Rezeptor inhibieren, gemeint. Die Antikörper sind hierbei sowohl gegen den Rezeptor als auch gegen ED<sub>b</sub> gerichtet, wobei die Peptide der Sequenz SEQ ID NO: 1 - 3 und stabilisierte Derivate davon sowie niedermolekulare Verbindungen zur Anwendung kommen.
- 10

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung einer Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

- 5 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Phagen gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, für eine pro-angiogene Therapie.

- 20 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, für diagnostische Zwecke.

- 25 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, in der Gentherapie.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Beschichten von Oberflächen, an die Endothelzellen binden.

Dabei ist bevorzugt, daß das Beschichten in vitro oder in vivo erfolgt.

- 5 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, in Zellkulturen.

- 10 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Transplantat.

Dabei ist bevorzugt, daß das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gefäß(e), Haut, Cornea, Nieren, Leber, Knochenmark, Herz, Lungen, Knochen, Thymus, Dünndarm, Pankreas, andere innere Organe sowie Teile und Zellen davon umfaßt.

- 15 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Implantat.

- 20 Dabei ist bevorzugt, daß das Implantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Lungenimplantate, künstliche Herzschrittmacher, künstliche Herzklappen, Gefäßimplantate, Endoprothesen, Schrauben, Schienen, Platten, Drähte, Nägel, Stäbe, künstliche Gelenke, Mammaplantate, künstliche Schädelplatten, künstliche Zähne, Zahnfüllungen und Zahnbrücken umfaßt.

Unter „Effekten, die für die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne spezifisch sind“ werden alle solche Effekte verstanden, die durch die ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne, nicht aber



durch EIII7, EIII8, etc. hervorgerufen werden. Ein solcher Effekt ist bspw. in Chen et al., 1998 (aaO) beschrieben, d.h. eine schnelle Tyrosin-Phosphorylierung mehrerer intrazellulärer Proteine, im Gegensatz zu der eher langsamen Phosphorylierung nach einer durch die Domänen EIII8-9-10 vermittelten Adhäsion. Unter „niedermolekularen Verbindungen“ werden alle Verbindungen verstanden, deren relative Molekülmasse unter etwa 1000 - 1200 liegt. Unter „Aptameren“ werden auf Nukleinsäuren aufgebaute Moleküle verstanden, die in der Lage sind, als hochspezifische Liganden für eine große Anzahl von Biomolekülen zu fungieren. Unter einer „pro-angiogenen Therapie“ wird jede Therapieform verstanden, bei der die Angiogenese gefördert werden soll. Unter einer „anti-angiogenen Behandlung/Therapie“ wird jede Behandlungs-/Therapieform verstanden, die auf eine Inhibierung der Angiogenese abzielt. Unter „Gentherapie“ wird jede Form der Therapie verstanden, die auf die Ausschaltung einer genbedingten Fehlfunktion bzw. auf die Wiederherstellung einer normalen Genfunktion bei Erkrankungen abzielt, die durch die Eliminierung oder Bereitstellung eines Proteins zu beeinflussen sind. Sie kann das Einschleusen von Fremd-DNA in Körperzellen beinhalten, ist jedoch nicht als hierauf beschränkt anzusehen. Unter „Zellkulturen“ sollen sowohl Zellkulturmedien als auch Zellkulturgefäße verstanden werden. Bevorzugt sind die Zellkulturgefäße ausgewählt aus der Gruppe, die Zellkulturflaschen, -schalen, -napfe, -platten, Mikrotiterplatten, 96-Napf-Platten, Zellkulturkolben und Bioreaktoren umfaßt.

„Diagnostische Zwecke“ sind alle Zwecke, die dem Erkennen eines Zustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle bzw. dem Zuordnen eines aktuellen Zustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle zu einer bestimmten Zustandskategorie (z. B. einer bestimmten Krankheit) dienen, beispielsweise kann dies der Einsatz eines Kits/chemischer Reagenzien/einer Meßeinrichtung sein, zum Bestimmen einer physikalischen Größe, wie Temperatur etc., oder einer chemischen Größe, wie Konzentration etc., soll jedoch nicht als hierauf beschränkt angesehen werden.

„Therapeutische Zwecke“ sind alle Zwecke, die der Verbesserung bzw. der Heilung eines Krankheitszustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle dienen. Unter dem Begriff „Verwendung eines Proteins zusammen mit einem Implantat“ ist entweder eine zeitlich oder eine räumlich identische Verwendung gemeint. Bei-

spielsweise können Proteinmoleküle an das Implantat bei dessen „Einbau“ in den Körper befestigt sein, oder aber sie können räumlich vom Implantat getrennt, aber zur gleichen Zeit wie dem „Einbau“ des Implantats verabreicht werden (Injektionen etc.).

- 5 Die Erfindung wird nunmehr detailliert anhand der folgenden Beispiele und Figuren beschrieben. Dabei zeigt:

Fig. 1 eine schematische Darstellung der in dieser Studie verwendeten Wiederholungssequenzen vom Typ III;

Fig. 2 die Resultate eines Proliferationsassay unter dem Einfluß der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne (ED-B) auf Endothelzellen bzw. menschliche Stromazellen auf verschiedenen Substraten;

Fig. 3 die Resultate eines Sprießtests (tube formation test) von Endothelzellen unter dem Einfluß von ED-B;

Fig. 4 die Resultate eines Anheftungstest, bei dem das Anheften von Endothelzellen an mit ED-B beschichteten Oberflächen getestet wurde;

Fig. 5 die Resultate eines Test, ähnlich zu dem in Fig. 4, mit der Ausnahme, daß die Zelle mit verschiedenen synthetischen Peptiden vorinkubiert wurden, deren Sequenzen Teilsequenzen der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne sind;

20 Fig. 6 die in Fig. 5 verwendeten Teilsequenzen der synthetischen Peptide aus der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne;

Fig. 7 die Resultate eines Anheftungstests von Endothelzellen an verschiedene synthetische ED-B-Peptide;

Fig. 8 die Lage der in Fig. 6 - 7 ermittelten synthetischen Peptide in einer Modellstruktur der Peptid-Hauptkette von ED-B;

Fig. 9 die Wirkung von der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne und eines aus Loop 5 stammenden Peptids (SEQ ID NO:2) auf die Induktion von Kapillar-ähnlichen Strukturen in einem Sprießtest (tube formation test);

Fig. 10 die Resultate zweier Affinitäts-Chromatographie-Läufe unter Verwendung von Fn-7-8-9 bzw. Fn-7-B-8-9 von Zell-Lysaten von Oberflächen-markierten menschlichen Hautendothelzellen;

Fig. 11 die Resultate zweier Affinitäts-Chromatographie-Läufe unter Verwendung von Fn-7-8-9 bzw. Fn-7-B-8-9 von Zell-Lysaten von Oberflächen-markierten menschlichen Haut-Stroma-Zellen.

Fig. 12 Affinitätschromatographische Reinigung des ED<sub>b</sub>B-Rezeptors.

Fig. 13 Immunhistologisch charakterisierte humane Tumor-Cryoschnitte.

**Fig. 1** zeigt verschiedene, in dieser Studie verwendete rekombinante Fibronectin-Fragmente, die unterschiedliche Domänen-Struktur mit unterschiedlichen Wiederholungssequenzen vom Typ III aufweisen. Dabei umfassen Fn-7-B-8-9 die Fibronectin-Domänen 7, ED<sub>b</sub>, 8 und 9, Fn-7-8-9 die Domänen 7, 8 und 9, ED-B die Domäne ED<sub>b</sub>, Fn-10 die Domäne 10 und Fn-6 die Domäne 6. Diese Proteine wurden als mit einem His-Tag versehene Proteine in E. coli exprimiert und auf einer Nickel-Chelat-Sepharosesäule aufgereinigt. Die in dieser Studie verwendeten Nummernbezeichnungen entsprechen den in der Literatur verwendeten. Dabei bezeichnen die Abkürzungen FN-B, ED-B, EDB und ED<sub>b</sub> alle jeweils die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne und sind als synonym anzusehen.

**Fig. 2** zeigt die Resultate eines Proliferationsassay, bei dem die Wirkung der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne (ED-B) auf die Proliferation von Endothelzellen (EC) bzw. Stroma-Zellen (SC) untersucht wurde. 1000 Zellen pro Napf wurden in 96-Napf-Platten inkubiert. Lösliches ED-B (10 µg/l) wurde dem Medium während des Proliferationsassays zugegeben. Nach drei Tagen wurde die Zellzahl mit dem MTS-Assay bestimmt. Die Proliferation der Zellen wurde durch basischen Fibronectin-Wachstumsfaktor (bFGF) induziert. Es zeigte sich, daß ED-B keine Wirkung in Abwesenheit von bFGF hatte, und ebenso konnte keine Wirkung für die Fibronek-

tin-Domäne 10 vom Typ III in Anwesenheit von bFGF auf die Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Wirkung von ED-B auf menschliche Endothelzellen-Proliferation konnte bei Zellen festgestellt werden, die auf Gelatine ausplattiert worden waren (EC/Gelatine), ebenso bei Zellen, die auf Collagen ausplattiert worden waren (EC/Collagen), wobei jedoch letzterer Effekt nicht so deutlich war, wie beim Ausplattieren auf Gelatine. Bei menschlichen Stroma-Zellen auf Gelatine (SC/Gelatine) fand eine Proliferation bereits in Abwesenheit von bFGF statt, die deutlich über der von menschlichen Endothelzellen lag. Sie konnte durch die Zugabe von bFGF bzw. bFGF + ED-B nicht gesteigert werden. Als Maß für die Zellzahl wurde die Extinktion bei 490 nm bestimmt.

Für den Proliferationsassay wurde folgende experimentelle Methode befolgt:

Material: 96-Napf-Platte (mit flachem Boden), Nunc

Medium: MCDB 131, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), hitze-inaktiviertes FCS (5 %)

15 Methode:

Zellen, 500-1000 pro Napf (96-Napf-Platte) in 100 µl, werden für 3 Tage in Medium mit bFGF (1 - 3 ng/ml) oder VEGF (30 - 50 ng/ml) kultiviert. Die genaue Menge sollte für jede Charge durch Titration bestimmt werden: optimal ist die minimale Konzentration, die maximale Proliferationsstimulation erreicht. Eine Synchronisation der Zellen vor dem Experiment ist nicht notwendig, kann aber gemacht werden. Nach 3 Tagen wird die Zellzahl mit dem MTS-Kit (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt. Es empfiehlt sich, die Absorption bei mehreren Zeitpunkten zu messen, um eine maximale Absorption im linearen Bereich zu erhalten (0,5; 1; 2; 4 Stunden).

25 Kontrollen:

Negative Kontrolle, kein Mitogen (keine Proliferation) (-bFGF/VEGF)

Positive Kontrolle, mit Mitogen (maximale Stimulation) (+bFGF/VEGF)

**Fig. 3** zeigt die Wirkung von ED-B auf das Sprießen von Endothelzellen aus Sphäroiden. Hierzu wurden HUVEC-Sphäroide (Human Umbilical Vein Endothelial Cells = menschliche Nabelschnur-Endothelzellen) in Collagen eingebettet und durch die Zugabe von 10 µg/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) zum Sprießen induziert in Ab- oder Anwesenheit von 6 µg/ml ED-B. Es zeigte sich, daß durch die Zugabe von bFGF alleine das Sprießen induziert und dann durch die Zugabe von ED-B weiter stimuliert werden konnte (+ bFGF + ED-B).

Für den Sprießtest (tube formation test) wurde folgende experimentelle Methode verwendet:

#### 10 Material:

Methylcellulose, höchste Viskosität (Sigma)  
 Trypsin/EDTA für Zellkultur (Gibco)  
 Rundboden 96-Napf-Platten (Greiner #650185)  
 rekombinantes bFGF (Gibco #13256-029)  
 rekombinantes VEGF (R & D System)  
 Anti-Ratte-CD31 (RDI #RDI-CD31TLD)  
 Heparin (Gibco #15077-027)

#### Lösungen:

20 PBS/Antibiotika: Zellkultur-PBS, 10 x Pen/Strep, 2,5 µg/ml Amphotericin  
 1 % Gelatine (Difco, autoklavieren und nach Abkühlung mit Pen/Strep und Amphotericin (0,25 µg/ml) versetzen

Medium: MCDB 131, Glutamin, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), hitzeinaktiviertes FCS (10 %)

25 Wachstumsmedium: Medium mit 2 ng/ml bFGF und 10 ng/ml VEGF

#### Zellen:

HUVEC

## Dermale MVEC (Passage >4)

### Methode:

Endothelzellen werden mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf 5000 Zellen/ml in Medium mit 0,24 % Methylcellulose verdünnt. Je 200 µl (1000 Zellen) werden in Näpfen einer Greiner-Platte gegeben und über Nacht inkubiert. Runde Zellhaufen (Sphäroide) werden mit einer 1 ml-Pipette mit abgeschnittener Spitze geerntet und abzentrifugiert. Sphäroide werden in 1,2 % Methylcellulose/FCS resuspendiert und mit neutralisiertem Collagengel gemischt. ED<sub>b</sub> und bFGF wurden co-polymerisiert.

Wie aus der Figur deutlich wird, erfolgt durch die Zugabe von ED-B eine deutliche Steigerung des Sprießens über das durch bFGF induzierte Maß hinaus.

**Fig. 4** zeigt die Resultate eines Adhäsionstest von Endothelzellen an Mikrotiter-napf-Platten, die mit ED-B beschichtet waren. Hierzu wurden Endothelzellen aus ihrem ursprünglichen Kulturgefäß durch Trypsinisierung (Trypsin/EDTA) von ihrem Substrat gelöst und dann in Mikrotiternapf-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen (0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 40 µg/ml) ED-B beschichtet waren, inkubiert und für eine Stunde zum Anhaften belassen. Als eine Negativ-Kontrolle dienten Näpfe, die mit 1 mg/ml BSA (bovinem Serumalbumin) beschichtet waren; die Adhäsion an BSA (< 10 %) wurde substrahiert.

Das Anheften wurde durch Färbung mit Kristallviolett quantifiziert, gefolgt von einer Lyse mit SDS. Die Quantifizierung erfolgte durch Messen der Extinktion bei 595 nm. Eine in der Figur waagrecht angebrachte Linie bei  $A_{595 \text{ nm}} \approx 1,06$  zeigt die 100 %ige Adhäsion an Plasma-Fibronektin an.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt an, daß die Zellen an den mit ED-B beschichteten Oberflächen anhaften, was einen Rezeptor auf der Zelloberfläche für ED-B nahelegt.

Für den Anheftungs/Adhäsionstest wurde folgende experimentelle Methode verwendet:

## Lösungen:

1 % BSA (Sigma, Ethanol-präzipitiert)

2 % Serum in PBS (oder eine Trypsin-Neutralisationslösung)

Medium: MCDB 131, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), 0,1 % BSA (Sigma, Äthanol-präzipitiert)

0,1 % Kristallviolett, 2 % Glutaraldehyd in PBS, sterilfiltriert

2 % SDS

## Methode:

Näpfe einer 96-Napf-Platte (Nunc) werden für eine Stunde bei 37°C mit Protein belegt. Bei kleinen Proteinen (<20 kDa) oder Peptiden empfiehlt es sich, diese auf der Platte trocknen zu lassen (über Nacht ohne Deckel unter der Sterilbank). Danach werden die Näpfe mit 1 % BSA für 1 h bei 37°C abgesättigt. Zellen werden mit 1 X Trypsin abgelöst, mit 2 % Serum zur Inaktivierung des Trypsins gewaschen, und in Medium resuspendiert. Wenn Antikörper oder Peptide getestet werden sollen, werden die Zellen in Suspension mit diesen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Pro Napf (96-Napf-Platte) werden  $10^4$  Zellen in einem Volumen von 50 - 100 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen, die Platte zum Abtropfen auf einem Papierhandtuch für 1 min umgedreht stehen lassen und angeheftete Zellen werden mit Kristallviolett/Glutaraldehyd für 15 min gefärbt und fixiert. Die Näpfe werden 3mal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend durch Zugabe von 2 % SDS lysiert (15 min auf dem Schüttler). Die Absorption bei 595 nm wird gemessen. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser können die Zellen, falls erwünscht, erneut angefärbt werden.

## Kontrollen:

Negative Kontrolle: Leer-Näpfe (BSA-Kontrolle)

Positive Kontrolle: Plasma-Fibronektin (2,5 µg/ml)

$$\% \text{ Adhäsion} = A_{595} (\text{Probe}) : 100 \times A_{595} (\text{Fibronektin})$$

**Fig. 5** zeigt die Resultate eines Test, ähnlich dem aus Fig. 4 mit der Ausnahme, daß vor dem Anheften an mit ED-B beschichteten Mikrotiternapf-Platten die Endothelzellen mit 250 µM verschiedener synthetischer Peptide vorinkubiert wurden, deren Sequenz eine Teilsequenz der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne war. Die Anheftung wurde durch die Bestimmung der Extinktion bei 595 nm ( $A_{595}$ ) bestimmt. Die in der Figur aufgetragenen Peptidbezeichnungen werden in Fig. 6 erläutert. Dabei entspricht Peptidsequenz Nr. 043 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Peptidsequenz Nr. 553 der SEQ ID NO:2, Peptidsequenz Nr. 038 der SEQ ID NO:3. Ein hoher  $A_{595}$ -Wert entspricht einer nicht-inhibierten Anhaftung, während ein niedriger  $A_{595}$ -Wert einer Inhibition der Anhaftung durch das entsprechende Peptid entspricht.

Die für Fig. 4 beschriebene Methode wurde befolgt.

**Fig. 6** zeigt die der Gesamtsequenz der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne entnommenen Teilsequenzen der synthetischen ED-B-Peptide mit den dazu gewählten Sequenzbezeichnungen. Es wird der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren verwendet.

**Fig. 7** zeigt die Resultate eines Tests, ähnlich zu dem in Fig. 5, außer, daß hier die Mikrotiternapf-Platten nicht mit der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne beschichtet waren, sondern mit den sich im Test aus Fig. 5 als inhibitorisch erwiesenen Peptiden, bzw. nicht-inhibitorisch erwiesenen Peptide vor-inkubiert wurden und somit mit diesen beschichtet wurden. Dabei zeigt es sich, daß die Zellen in diesen Tests nunmehr bei einer Beschichtung mit jeweils eines der inhibitorischen Peptide Anheftung zeigen, gemessen am  $A_{595}$ -Wert, während ein aus Fig. 5 als nicht-inhibitorisches erwiesenes Peptid zu keiner Anheftung führt.

Die für Fig. 4 beschriebene Methode wurde befolgt.

**Fig. 8** zeigt eine Modellstruktur der ED<sub>b</sub>-Fibronektin-Domäne (ED-B), aus dem die Lage der inhibitorischen Peptide Nr. 1 (= SEQ ID NO:1), Nr. 2 (= SEQ ID NO:2) und Nr. 3 (= SEQ ID NO:3) hervorgeht. Es zeigt sich, daß sich diese inhibitori-



schen Peptide auf Loop 1 bzw. Loop 5 der ED-B-Struktur befinden und damit die Region der Domäne identifizieren, über die eine Bindung zur Zelle bzw. dem auf der Zelle befindlichen Rezeptor stattfindet. Die in Fig. 8 gezeigte Modellstruktur der ED-B-Domäne beruht auf einer bereits ermittelten Struktur der Fibronectin-Domäne 7 vom Typ III. N-T und C-T stehen für N- bzw. C-Terminus.

**Fig. 9** zeigt die Resultate eines Tests, bei dem die Wirkung der Zugabe von ED-B und dem zuvor als inhibitorisch ermittelten Peptid Nr. 2 sowie die Zugabe der Fibronectin-Domäne 6 vom Typ III auf die Induktion von Kapillar-ähnlichen Strukturen (tube formation) im Sprießtest untersucht wird. Es zeigt sich, daß über dem basalen, durch bFGF induzierten Eindringen in Collagen-Gele die größte Wirkung durch das Anheftungs-inhibitorische Peptid SEQ ID NO:2 erzeugt wird. Dieses Peptid hat also eine stimulatorische Wirkung auf das Eindringen von Endothelzellen in Collagen-Gele. Dieses Peptid entspricht daher der Bindungsregion von ED<sub>b</sub> und stimuliert, in Analogie zu ED<sub>b</sub> selbst, das Eindringen von Endothelzellen in das Collagen.

Die für Fig. 3 beschriebene Methode wurde befolgt.

**Fig. 10** zeigt die Resultate einer Affinitätschromatographie von Zell-Lysat aus Oberflächen-markierten, menschlichen Hautendothelzellen. Hierzu wurden proliferierende, an der Zelloberfläche biotinylierte Endothelzellen mit einem Detergenz lysiert und einer Affinitätschromatographie unterzogen, bei der kurze Fragmente Fibronectin mit oder ohne die eingefügte ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne an Sepharose gekoppelt waren (mit der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne = Fn-7-B-8-9, ohne die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne = Fn-7-8-9). Es konnte gezeigt werden, daß ein biotinyliertes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 - 130 kDa spezifisch an das ED-B-enhaltende Fragment bindet (siehe Pfeil). Die Elution erfolgt mittels EDTA. Es wurden mehrere, im folgenden beschriebene Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend SDS-PAGE unterzogen und mit Western-Blot mit Streptavidin-Peroxidase- und Chemolumineszenz (ECL) untersucht. Die Spuren 1 und 5 zeigen Prä-Elutions-Fraktionen, während die Spuren 2, 3, 4 bzw. 6, 7, 8 die eluierten Fraktionen 1, 2 und 3 zeigen. Spuren 1 - 4 zeigen die Chromatographie mit Fn-7-8-9, während Spuren 5 - 8 die Chromatographie mit Fn-7-B-8-9 zeigen. Das hier gezeigte Resultat ist ein starkes Indiz dafür, daß die promi-

nente Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 120 - 130 kDa ein Protein ist, das spezifisch an ein ED<sub>b</sub>-enthaltende Fibronectin-Fragment bindet und somit einen Rezeptor für die ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne darstellt.

Für die Biotinylierung und Lyse der Endothelzellen wurde folgende experimentelle

5 Methode befolgt:

Material: Biotinamidohexansäure-3-sulfo-N-Hydroxysuccinimid-Ester; Sigma  
PBS w/o Mg/Ca (Dulbecco)

Hepes-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,6, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µM MgCl<sub>2</sub>, 0,1  
% NaN<sub>3</sub>,

10 1 % CHAPS (V/V)

und Boehringer vollständiger Mini Protease-Inhibitor, EDTA-frei,  
Cocktail-Tabletten

Methode: Die Zellkulturflaschen werden vor und nach dem Biotinylieren jeweils  
3mal mit PBS w/Ca + Mg gewaschen. Vor dem letzten Waschvorgang wird der  
15 Biotinpuffer (1mg/15ml PBS) angesetzt. In jede der Flaschen werden langsam 5  
ml des Puffers (für 225 cm<sup>2</sup>) oder 12,5 ml (500 cm<sup>2</sup> Platten) in die Mitte des Bo-  
dens pipettiert, so daß sich das Volumen über den ganzen Flaschenboden unter  
Schwenken verteilen kann. Dann wird die erste Kulturflasche mit der Hälfte des  
Lysepuffervolumens behandelt. Der Puffer wird ebenfalls in die Mitte des Fla-  
schenbodens pipettiert und über die gesamte Oberfläche verteilt. Dann werden die  
20 Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Anschließend wird das Gesamt-  
volumen der 1. Kulturflasche in die 2. Flasche pipettiert, wo der Vorgang dann  
wiederholt wird. Nach der letzten Flasche wird das Volumen in ein 50 ml koni-  
sches Zentrifugenröhrchen überführt. Mit der anderen Hälfte des Lysepuffers wird  
25 dieser Vorgang in allen Kulturflaschen wiederholt (ohne Zellschaber) und das  
Endvolumen ebenfalls in Zentrifugenröhrchen gegeben. Zentrifugiert wird in 50 ml  
konischen Zellkulturröhrchen bei 3000 U/min, 5 min bei RT (Heraeus-  
Tischzentrifuge). Das Lysat wird abpipettiert und sollte idealerweise sofort für die  
Affinitätschromatographie eingesetzt werden (kann notfalls aber auch bei -80°C  
30 eingefroren werden).

Für die kovalente Kopplung von Proteinen an Sepharose wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Material: aktivierte CH Sepharose 4 B Pharmacia Biotech,  
Code-No. 17-0490-01

5 1 mmol HCl, 2,2 % NaHCO<sub>3</sub>

Methode: Die HCl wird im Eisbad gekühlt, die Sepharose läßt man auf Raumtemperatur erwärmen.

Dann wird die Sepharose mit 1 mmol HCl gewaschen. Pro ml Sepharose benötigt man 10 ml HCl. Die Sepharose läßt man langsam in das vorgekühlte Röhrchen rieseln, wo sie dann für etwa 15 Minuten aufquillt. (1 g Sepharose entspricht 3 ml gequollener Sepharose). Anschließend wird das Röhrchen für 1 Min. bei 800 U zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen.

Dieser Vorgang wird 3mal wiederholt.

Nach dem 3. Waschen wird erneut HCl zugegeben, das Röhrchen wird geschwenkt und 3 - 5 Min. bei 800 U zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet wird mit 20 ml Millipore-Wasser gelöst und in 2 neue Zentrifugenröhrchen überführt (je 1 Röhrchen für 7-EDB-8-9 Sepharose und für 7-8-9 Sepharose, d.h. Sepharose, an die ein Polypeptid mit den Repeats III7, ED<sub>b</sub>, III8 und III9 bzw. III7, III8 und III9 gekoppelt ist.). Die Röhrchen werden sofort wieder abzentrifugiert, der Überstand wird abpipettiert und die 1 -5 mg Protein/ml Sepharose können gekoppelt werden.

(d. h. 2 mg Protein/ml Sepharose 7-8-9

2 mg „ „ 7-EDB-8-9)

Die Röhrchen werden durch Umschwenken gemischt. Dann erfolgt zügig die Zugabe von 2,2 % NaHCO<sub>3</sub>. (50 µl/ml Gel). Dadurch wird die restliche HCl neutralisiert. Die Röhrchen werden umgeschwenkt und bei höchster Stufe auf einem „Wipptisch“ für 1 – 5 Std. durchgemischt.

Anschließend werden die Röhrchen wieder abzentrifugiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration, die bei der kovalenten Kopplung an Sepharose eingesetzt werden soll, wurde ein Bradford-Test durchgeführt:

Material: BSA-Stammlösung 2 mg/ml  
Bradford Reagenz

Methode: Die BSA-Lösung wird wie folgt auf eine Nunc-Immuno-Plate (Maxi Sorp) aufgetragen: 5µg-4µg-3µg-2µg-1µg (80 µl Vol. + 20 µl Assay)

Vorverdünnung für BSA:  $5\mu\text{g}/50\mu\text{l} = 0,1 \text{ mg/ml}$

Die Stammlsg. 2 mg/ml wird durch eine 1:20-Verdünnung auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt.

Zur Durchführung der Affinitätschromatographie bzw. zur Elution wurde folgendes Vorgehen gewählt:

#### a) Affinitätschromatographie

Material: aktivierte CH Sepharose 4B Pharmacia Biotech,  
Code-No. 17-0490-01

Puffer A (20 mM Hepes pH 7,6, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 %  $\text{NaN}_3$ )

Puffer B (Puffer A + 150 mM NaCl + 0,1 % Chaps)

Puffer C (Puffer A + 0,1 % Chaps)

PH 4-Puffer (Millipore-Wasser + 0,1 % Eisessig + 0,1 % Chaps)

EDTA-Puffer (Puffer A + 200 mM EDTA pH 8,5 + 0,1 % Chaps)

Methode: Das Lysat wird zunächst 3 x über die Säule geschickt.

Unter der Säule befindet sich ein Röhrchen zum Auffangen der Flüssigkeit. Die ersten 2 ml des Lysats werden vorsichtig mit einer Eppendorfpipette auf das Gel gegeben. Für das weitere Lysatvolumen verwendet man eine Meßpipette. Zu beachten ist, daß die Säule gerade ist. Wird die Säule zum ersten Mal benutzt, wird vor dem eigentlichen Durchlauf ein „Trockendurchlauf“ mit allen proteinfreien Puffern durchgeführt. Eine Säulenfüllung sollte maximal 5 x benutzt werden.

Wenn das Lysat eingefroren (-80°C) vorliegt, wird es zunächst im Wasserbad erwärmt und dann zentrifugiert (5 min. bei 3000 U).

Frisches Lysat ist jedoch immer dem eingefrorenen vorzuziehen.

Von dem Lysat werden 500 µl in ein Eppendorfgefäß abpipettiert.

- 5 Dies dient zur Untersuchung des Lysats vor und nach der Chromatographie..

Werden 2 Säulen verwendet (je eine für 7-8-9 Sepharose und für 7-B-8-9 Sepharose), wird jeweils die Hälfte des Lysatvolumens über jede der Säulen geschickt. Beide Säulen sollten dieselbe Flußrate haben. Ist dies nicht der Fall, wird die „langsamere“ Säule entsprechend lange geschlossen. Die ideale Flußrate beträgt 0,2 - 0,5 ml/min.

Ist das Lysat 3 x durch die Säule gelaufen, wird von dem Durchlauf, nachdem er gemischt wurde, ebenfalls 500 µl in ein Eppendorfgefäß pipettiert, damit auch hier eine Untersuchung erfolgen kann.

Anschließend werden je 10 Säulenvolumina Puffer B und Puffer C über die Säule geschickt. Danach ist der Waschvorgang abgeschlossen.

## b) Elution

Präelution: Puffer C wird über die Säule geschickt, damit festgestellt werden kann, ob trotz der Waschprozedur noch Proteine verblieben sind. 500 µl werden in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. (Bei 2 Säulen entsprechend 2 x 500 µl).

- 20 EDTA-Elution: EDTA komplexiert die Ca- und Mg-Ionen. Dadurch werden die Endothelzell-Proteine eluiert, die Ca und Mg zur Bindung benötigen. 2 x 4 ml EDTA-Puffer werden über die Säule (bzw. über beide Säulen) geschickt und in 2 Fraktionen (E1 u. E2 / BE1 u. BE 2) in Falcon-Röhrchen aufgefangen. Dann wird der Röhrcheninhalt gemischt und 5000 µl werden in ein (bzw. 2) Eppendorfgefäß(e)  
25 abpipettiert.

pH 4-Elution: Der eigentliche pH-Wert des Puffers beträgt 3,7. Außerhalb des neutralen pH-Bereiches (pH 6 - 8) kann man die Bindung des Rezeptors an sein

Protein hemmen. Auch hier werden wie bei der EDTA-Elution 2 x 4 ml PH 4-Puffer über die Säule geschickt, in 2 Fraktionen gesammelt und jeweils 500 µl abpipetiert (4,1 u. 4,1 / B 4,1 und B 4,2).

- 5    Anschließend werden 3 Säulenvolumen Puffer A über die Säule gegeben, damit die Säure herausgewaschen wird. Das letzte Säulenvolumen verbleibt in der Säule. Die Säule wird geschlossen und im Kühlschrank verwahrt.

Die 500 µl-Fraktionen in den Eppendorfgläsern werden für mind. 15 Min. bei -80°C eingefroren und anschließend in einem „Speed vac“ gefriergetrocknet.

- 10    Die so erhaltenen Fraktionen bzw. Prä-Elutions-Fraktionen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und einem Western Blot unter reduzierenden Bedingungen unterzogen.

- 15    **Fig. 11** zeigt dasselbe Experiment wie in Fig. 10, mit der Ausnahme, daß hier nicht lysierte Endothelzellen, sondern lysierte Stroma-Zellen verwendet werden. In dem in Fig. 11 gezeigten Western-Blot zeigen die Spuren 1 - 3 die Elution von einer Affinitätssäule mit Fn-7-8-9, während die Spuren 4 - 6 die Elution von einer Affinitätssäule von Fn-7-B-8-9 zeigen. Spuren 1 und 4 sind Prä-Elutionsfaktoren, während Spuren 2, 3 bzw. 5, 6 die Fraktionen 1 und 2 des jeweiligen Elutionslaufes zeigen. Eine prominente Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 - 130 kDa, wie sie in Fig. 10 zu sehen ist, kann bei diesem Zell-Lysat aus  
20    menschlichen Stroma-Zellen nicht festgestellt werden.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

- 25    **Fig. 12** zeigt das ED-B-Bindungsprotein, welches mittels Affinitätschromatografie, wie beschrieben, aufgereinigt und mittels SDS-Gradientengelelektrophorese (4-12%) aufgetrennt wurde. Die spezifisch angereicherten Doppel-Banden (Pfeile) wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektroskopie analysiert.

Die Sequenzanalyse identifizierte das isolierte Protein eindeutig als das alpha2-beta1-Integrin, wobei die prädominante, schwere Bande der beta1-, die leichte Bande der alpha2-Untereinheit entspricht.

- 5 Dieser Befund spricht dafür, daß die Bindung an EDB hauptsächlich durch die beta1-Untereinheit des Integrins vermittelt wird. Entsprechend des untersuchten Zelltyps können auch andere alpha-Untereinheiten (e.g. alpha2) mit beta1 kombiniert die Bindung an EDB-FN vermitteln.

10 **Fig. 13** zeigt immunhistologisch charakterisierte humane Tumor-Cryoschnitten, wobei bedeuten:

A: Nierenzellkarzinom, Pfeile zeigen die spezifische Färbung mittels AK AM-EDBr-2

B: Close-up des selben Präparates

C: Hepatozelluläres Karzinom

15 D: Melanom (hier wurde keine spezifische Färbung gefunden)

## Analyse des EDB-Rezeptors

Die Banden wurden aus einem 1D-Gel ausgeschnitten, mit  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung und Acetonitril gewaschen, getrocknet und mit Trypsinlösung zur Proteolyse der Proteine im Gel versetzt. Die aus dem Gel in die Verdauungslösung eluierten Peptide wurden über  $\mu\text{C}_{18}$ -Säulen aufkonzentriert und entsalzt und mit MALDI-Massenspektrometrie vermessen (= Liste von Peptidmassen des verdauten Proteins).

Mit den gefundenen Peptidmassen aus jeder Gelbande wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Bei nicht eindeutigen Suchergebnissen wurden zusätzlich MALDI-PSD-Spektren (Fragmentspektren) eines einzelnen Peptids vermessen. Die Spektren wurden entweder direkt zur Bestätigung einer vermuteten Peptidsequenz verwendet (Interpretation des Spektrums) oder es wurde eine Datenbanksuche mit diesen Spektren durchgeführt.

### Untersuchte Banden:

Bande A =   Bande 1 aus Präparation 6  
               Bande 4 aus Präparation 5  
               Bande 6 aus der sauren Elution

### Ergebnis: Integrin $\alpha 2$

- siehe Datenbanksuchergebnis Bande 4
- die Spektren aus Bande 1 und 6 zeigen die gleichen intensivsten Peptide  
 ein PSD-Spektrum eines Peptids aus Bande 1 bestätigt eine Teilsequenz von Integrin  $\alpha 2$

Bande B =   Bande 2 aus Präparation 6  
               Bande 5 aus Präparation 5  
               Bande 7 aus der sauren Elution



## Ergebnis: Integrin $\beta 1$

- siehe Datenbanksuchergebnisse Bande 5 und 7
- das Spektrum aus Bande 2 zeigt die gleichen intensivsten Peptide
- die Datenbanksuche mit einem PSD-Spektrum aus Bande 2 bestätigte Integrin  $\beta 1$

## BSA

- ist in allen drei Banden enthalten
- durch die Datenbanksuche mit einem PSD-Spektrum und zahlreiche Peptidmassen bestätigt

```
function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}
```

## ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

```
A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display == "none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src = "/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }
```

**Protein Candidates** for search 20010208092948-0121-149234049162 [121056 sequences searched]

Ran	Probabili	Est'd	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa
k	ty	Z				
1	1.0e+000	2.20	<a href="#">gi 4504743 ref NP_002194.1 </a> integrin alpha 2 precursor	19	5.2	129.28
+2	2.3e-010	-	<a href="#">gi 628012 pir A53933</a> myosin I myr 4 - rat	15	9.6	116.17
	-	-	<a href="#">gi 6981242 ref NP_037115.1 </a> unconventional myosin from rat 4 for myosin I heavy chain	15	9.6	116.12
3	8.3e-011	-	<a href="#">gi 7513010 pir T00322</a> hypothetical protein KIAA0542 - human	15	11.5	117.58
4	1.7e-012	-	<a href="#">gi 4210973 gb AAD12058.1 </a> (AF105016) vacuolar proton translocating ATPase 116-kDa subunit a2 isoform; V-ATPase 116-kDa isoform a2 isoform [Bos taurus]	11	5.9	97.99

5	5.4e-013	-	<a href="#">gi 543747 sp P36633 ABP_RAT</a> AMILORIDE-SENSITIVE AMINE OXIDASE [COPPER-CONTAINING] PRECURSOR (DIAMINE OXIDASE) (DAO) (AMILORIDE-BINDING PROTEIN) (ABP) (HISTAMINASE)	<a href="#">16</a>	6.6	85.0 0
6	4.2e-013	-	<a href="#">gi 7656867 ref NP_055059.1 </a> a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	<a href="#">12</a>	6.8	134. 71
7	8.6e-014	-	<a href="#">gi 3688530 emb CAA09465.1 </a> (AJ011035) phospholipase C beta 2 [Rattus norvegicus]	<a href="#">11</a>	5.8	134. 87
+8	6.5e-014	-	<a href="#">gi 4504085 ref NP_000399.1 </a> glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	<a href="#">21</a>	7.0	80.8 0
-	-	-	<a href="#">gi 7446012 pir G02093</a> glycerol-3-phosphate dehydrogenase – human	<a href="#">21</a>	7.3	80.8 2
9	5.0e-014	-	<a href="#">gi 7513725 pir T29098</a> microtubule-associated protein 4, muscle- specific - mouse (fragment)	<a href="#">14</a>	8.1	114. 87
10	4.7e-014	-	<a href="#">gi 6005970 ref NP_009078.1 </a> zinc finger protein 175	<a href="#">22</a>	9.6	81.5 9

## NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

## Input Summary

Date &amp; Time Thu Feb 08 08:29:55 2001 UTC (Search Time: 6.30 sec.)

Sample ID EDB Fibronectin, Bande 4

Database NCBI nr [..\databases\nr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 135 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

935.536 1007.504 1179.635 1222.729 1277.731 1307.689 1473.816 1479.833

Peptide Masses 1510.835 1553.895 1567.768 1586.801 1638.888 1707.772 1819.830

(Da,Monoisotopic) 1851.993 1915.959 1931.980 1947.990 1973.966 1993.998 2044.968

2051.077 2068.095 2095.065 2150.093 2224.097 2283.137 2344.115

2501.214 2705.123 2775.304 2872.336 2902.333 2932.502 3052.424  
3280.542

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 37

des

ProteoMetrics' ProFound is based on [ProFound](#) at [The Rockefeller University](#) [search + transmission time: >=6.33 sec]

```
function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}
```

### ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

```
A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display == "none"){E1.style.display = " ";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src = "/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }
```

**Protein Candidates** for search 20010207110038-0035-149234049162 [121056 sequences searched]

Ran	Probabili	Est'd	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa
k	ty	Z				
+1	1.0e+000	1.15	<a href="#">gi 124963 sp P05556 ITB1_HUMAN</a> FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	<u>17</u>	5.3	88.45
			<a href="#">gi 762977 emb CAA33272.1</a> (X15202) Fn receptor beta prechain [Mus musculus]	<u>11</u>	5.8	88.18
			<a href="#">gi 72070 pir IJMSFB</a> fibronectin receptor beta chain precursor - mouse	<u>11</u>	5.8	88.31
			<a href="#">gi 8393636 ref NP_058718.1</a> integrin, beta 1	<u>11</u>	5.8	88.48
			<a href="#">gi 124964 sp P09055 ITB1_MOUSE</a> FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1)	<u>11</u>	5.7	88.21
			<a href="#">gi 10336839 gb AAG16767.1 AF192528_1</a> (AF192528) integrin beta-1 subunit [Sus scrofa]	<u>11</u>	5.3	88.25
			<a href="#">gi 1708573 sp P53712 ITB1_BOVIN</a> FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	<u>9</u>	5.3	85.31
			<a href="#">gi 1708574 sp P53713 ITB1_FELCA</a> FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	<u>9</u>	5.2	88.08
			<a href="#">gi 5453910 ref NP_006216.1</a> phospholipase C, delta 1	<u>8</u>	6.2	85.75
			<a href="#">gi 1589134 prf 2210313A</a> phosphatidylinositol 3-	<u>10</u>	5.9	83.4
2	1.9e-004	-				
+3	7.7e-005	-				

			kinase:SUBUNIT=55kD regulatory [Rattus norvegicus]			6
-	-		<a href="#">gi 6981358 ref NP_037137.1 </a> phosphoinositide 3-kinase p85 (other splicing variants: p55 and p50)	<u>8</u>	5.9	83.5 1
4	1.8e-005	-	<a href="#">gi 1163174 gb AAA85505.1 </a> (U32575) similar to yeast Sec6p, Swiss-Prot Accession Number P32844; similar to mammalian B94, Swiss-Prot Accession Number Q03169; Method: conceptual translation supplied by author [Rattus norvegicus]	<u>8</u>	5.8	86.4 8
5	1.1e-005	-	<a href="#">gi 2137061 pir PC4183</a> 1-phosphatidylinositol phosphodiesterase (EC 3.1.4.10) delta 1 - Chinese hamster (fragment)	<u>10</u>	5.9	84.6 2
6	6.1e-006	-	<a href="#">gi 9910238 ref NP_064388.1 </a> general control of amino acid synthesis, yeast homolog-like 2	<u>10</u>	9.6	93.3 7
7	2.4e-006	-	<a href="#">gi 10047327 dbj BAB13451.1 </a> (AB046845) KIAA1625 protein [Homo sapiens]	<u>6</u>	9.0	97.2 0
8	1.1e-006	-	<a href="#">gi 5032191 ref NP_005793.1 </a> tumor protein p53-binding protein	<u>10</u>	9.7	93.4 8
+9	9.9e-007	-	<a href="#">gi 9910260 ref NP_064581.1 </a> HCNP protein	<u>9</u>	8.7	98.8 6
-	-	-	<a href="#">gi 6330235 dbj BAA86491.1 </a> (AB033003) KIAA1177 protein [Homo sapiens]	<u>6</u>	5.6	87.8 0
+10	9.6e-007	-	<a href="#">gi 9453796 emb CAB99365.1 </a> (AL117378) dJ131F15.2 (phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase 1 (homologous to mouse Ly-41 antigen) (PC1, NPPS)) [Homo sapiens]	<u>11</u>	6.8	96.8 3
-	-	-	<a href="#">gi 129678 sp P22413 PC1_HUMAN</a> PLASMA-CELL MEMBRANE GLYCOPROTEIN PC-1 [INCLUDES: ALKALINE PHOSPHODIESTERASE I ; NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE (NPPASE)]	<u>7</u>	6.8	99.9 1

## NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

## Input Summary

Date &amp; Time Wed Feb 07 10:00:44 2001 UTC (Search Time: 5.91 sec.)

Sample ID EDB Fibronectin, #0824, Bande 5

Database NCBIInr [..\databases\inr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 100 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

881.288 927.495 983.498 1007.525 1222.666 1376.820 1422.642 1439.854

Peptide Masses 1475.797 1479.791 1553.852 1567.742 1638.888 1781.886 1915.892

(Da,Monoisotopic) 1961.078 2019.135 2044.949 2225.083 2283.131 2470.203 3143.411

3299.415 3323.912 3337.675

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 25

des

ProteoMetrics' ProFound is based on [ProFound](#) at [The Rockefeller University](#) [search + transmission time: >=5.94 sec]

function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}

## ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display == "none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src = "/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }

**Protein Candidates** for search 20010207110746-00D6-149234049162 [121056 sequences searched]

R

a

<u>n</u> <u>Probability</u>	<u>Est'd</u> <u>Z</u>	<u>Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)</u>	<u>%</u>	<u>pI</u>	<u>kDa</u>
+		<a href="#">gil124963 sp P05556 ITB1_HUMAN</a> FIBRONECTIN RECEPTOR			
1 1.0e+000	1.61	BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	<u>18</u>	5.3	88.4 5
-	-	<a href="#">gil10336839 gb AAG16767.1 AF192528_1</a> (AF192528) integrin beta-1 subunit [ <i>Sus scrofa</i> ]	<u>12</u>	5.3	88.2 5
-	-	<a href="#">gil762977 emb CAA33272.1</a> (X15202) Fn receptor beta prechain [ <i>Mus musculus</i> ]	<u>12</u>	5.8	88.1 8
-	-	<a href="#">gil72070 pir  IJMSFB</a> fibronectin receptor beta chain precursor - mouse	<u>12</u>	5.8	88.3 1

-	-	<a href="#">gi 124964 sp P09055 ITB1</a> MOUSE FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1)	<u>12</u>	5.7	88.2 1
-	-	<a href="#">gi 8393636 ref NP_058718.1 </a> integrin, beta 1	<u>12</u>	5.8	88.4 8
-	-	<a href="#">gi 1708573 sp P53712 ITB1</a> BOVIN FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	<u>10</u>	5.3	85.3 1
-	-	<a href="#">gi 1708574 sp P53713 ITB1</a> FELCA FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	<u>11</u>	5.2	88.0 8
23.1e-006	-	<a href="#">gi 479805 pir S35458</a> SNF2 protein homolog - human (fragment)	<u>12</u>	7.0	88.5 9
+					
37.7e-007	-	<a href="#">gi 5725250 emb CAB52406.1 </a> (AJ245661) G7 protein [Homo sapiens]	<u>8</u>	5.9	94.6 5
-	-	<a href="#">gi 3108220 gb AAC62533.1 </a> (AF048986) MutS homolog 5 [Homo sapiens]	<u>8</u>	6.0	92.8 7
-	-	<a href="#">gi 4505253 ref NP_002432.1 </a> mutS (E. coli) homolog 5	<u>8</u>	6.0	92.8 6
46.7e-007	-	<a href="#">gi 7512247 pir  65253</a> disintegrin-like testicular metalloproteinase (EC 3.4.24.-) IVb - crab-eating macaque (fragment)	<u>14</u>	6.6	80.8 2
51.8e-007	-	<a href="#">gi 10438454 dbj BAB15248.1 </a> (AK025824) unnamed protein product [Homo sapiens]	<u>19</u>	6.4	80.6 0
65.4e-008	-	<a href="#">gi 1586344 prf  2203411A</a> reeler gene [Mus musculus]	<u>10</u>	5.7	99.3 7
73.0e-008	-	<a href="#">gi 4503165 ref NP_003581.1 </a> cullin 3	<u>16</u>	9.0	88.9 1
+					
81.4e-008	-	<a href="#">gi 6681275 ref NP_031934.1 </a> eukaryotic elongation factor-2 kinase	<u>14</u>	5.2	81.7 2
-	-	<a href="#">gi 6978795 ref NP_037079.1 </a> eukaryotic elongation factor 2 kinase	<u>9</u>	5.1	81.4 7
91.2e-008	-	<a href="#">gi 7662434 ref NP_055733.1 </a> KIAA0990 protein	<u>15</u>	9.5	91.7 1
5.2e-009	-	<a href="#">gi 7662436 ref NP_055749.1 </a> KIAA0996 protein	<u>13</u>	5.8	96.6

1

8

0

## NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol ®.

2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

## Input Summary

Date & Time Wed Feb 07 10:07:52 2001 UTC (Search Time: 5.88 sec.)

Sample ID EDB Fibronektin, #0824, Bande 7

Database NCBIInr [..\databases\Inr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 100 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

881.213 983.479 1222.615 1266.561 1376.698 1422.672 1473.821 1479.786

Peptide Masses

(Da,Monoisotopic)

1553.850 1567.725 1639.856 1781.886 1819.830 1915.945 1931.961

1961.051 2019.150 2068.101 2224.061 2283.101 2344.093 2470.201

2501.215 2705.264 2776.358 2840.545 2872.558 3052.493 3143.494

3159.559 3280.571 3298.572

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 32

des

5 ProteoMetrics' ProFound is based on ProFound at The Rockefeller University [search + transmission time: >=5.91 sec]

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Schering AG

5 <120> Rezeptor der ED<sub>b</sub>-Fibronectin-Domäne

<130> s5495

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. I für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-Molekül

20

<400> 1

Val Asp Ile Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu

1

5

10

15

25

<210> 2

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. II für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-Molekül

<400> 2



Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp

1 5 10 15

5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. III für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-

10 Molekül

<400> 3

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr

1 5 10 15

15

<210> 4

<211> 91

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser

1 5 10 15

25

Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly

20 25 30

30 Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu

35 40 45

Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu

50 55 60

Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly

65

70

75

80

5 Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr Gln Gln Thr

85

90

100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000  
1001  
1002  
1003  
1004  
1005  
1006  
1007  
1008  
1009  
1010  
1011  
1012  
1013  
1014  
1015  
1016  
1017  
1018  
1019  
1020  
1021  
1022  
1023  
1024  
1025  
1026  
1027  
1028  
1029  
1030  
1031  
1032  
1033  
1034  
1035  
1036  
1037  
1038  
1039  
1040  
1041  
1042  
1043  
1044  
1045  
1046  
1047  
1048  
1049  
1050  
1051  
1052  
1053  
1054  
1055  
1056  
1057  
1058  
1059  
1060  
1061  
1062  
1063  
1064  
1065  
1066  
1067  
1068  
1069  
1070  
1071  
1072  
1073  
1074  
1075  
1076  
1077  
1078  
1079  
1080  
1081  
1082  
1083  
1084  
1085  
1086  
1087  
1088  
1089  
1090  
1091  
1092  
1093  
1094  
1095  
1096  
1097  
1098  
1099  
1100  
1101  
1102  
1103  
1104  
1105  
1106  
1107  
1108  
1109  
1110  
1111  
1112  
1113  
1114  
1115  
1116  
1117  
1118  
1119  
1120  
1121  
1122  
1123  
1124  
1125  
1126  
1127  
1128  
1129  
1130  
1131  
1132  
1133  
1134  
1135  
1136  
1137  
1138  
1139  
1140  
1141  
1142  
1143  
1144  
1145  
1146  
1147  
1148  
1149  
1150  
1151  
1152  
1153  
1154  
1155  
1156  
1157  
1158  
1159  
1160  
1161  
1162  
1163  
1164  
1165  
1166  
1167  
1168  
1169  
1170  
1171  
1172  
1173  
1174  
1175  
1176  
1177  
1178  
1179  
1180  
1181  
1182  
1183  
1184  
1185  
1186  
1187  
1188  
1189  
1190  
1191  
1192  
1193  
1194  
1195  
1196  
1197  
1198  
1199  
1200  
1201  
1202  
1203  
1204  
1205  
1206  
1207  
1208  
1209  
1210  
1211  
1212  
1213  
1214  
1215  
1216  
1217  
1218  
1219  
1220  
1221  
1222  
1223  
1224  
1225  
1226  
1227  
1228  
1229  
1230  
1231  
1232  
1233  
1234  
1235  
1236  
1237  
1238  
1239  
1240  
1241  
1242  
1243  
1244  
1245  
1246  
1247  
1248  
1249  
1250  
1251  
1252  
1253  
1254  
1255  
1256  
1257  
1258  
1259  
1260  
1261  
1262  
1263  
1264  
1265  
1266  
1267  
1268  
1269  
1270  
1271  
1272  
1273  
1274  
1275  
1276  
1277  
1278  
1279  
1280  
1281  
1282  
1283  
1284  
1285  
1286  
1287  
1288  
1289  
1290  
1291  
1292  
1293  
1294  
1295  
1296  
1297  
1298  
1299  
1300  
1301  
1302  
1303  
1304  
1305  
1306  
1307  
1308  
1309  
1310  
1311  
1312  
1313  
1314  
1315  
1316  
1317  
1318  
1319  
1320  
1321  
1322  
1323  
1324  
1325  
1326  
1327  
1328  
1329  
1330  
1331  
1332  
1333  
1334  
1335  
1336  
1337  
1338  
1339  
1340  
1341  
1342  
1343  
1344  
1345  
1346  
1347  
1348  
1349  
1350  
1351  
1352  
1353  
1354  
1355  
1356  
1357  
1358  
1359  
1360  
1361  
1362  
1363  
1364  
1365  
1366  
1367  
1368  
1369  
1370  
1371  
1372  
1373  
1374  
1375  
1376  
1377  
1378  
1379  
1380  
1381  
1382  
1383  
1384  
1385  
1386  
1387  
1388  
1389  
1390  
1391  
1392  
1393  
1394  
1395  
1396  
1397  
1398  
1399  
1400  
1401  
1402  
1403  
1404  
1405  
1406  
1407  
1408  
1409  
1410  
1411  
1412  
1413  
1414  
1415  
1416  
1417  
1418  
1419  
1420  
1421  
1422  
1423  
1424  
1425  
1426  
1427  
1428  
1429  
1430  
1431  
1432  
1433  
1434  
1435  
1436  
1437  
1438  
1439  
1440  
1441  
1442  
1443  
1444  
1445  
1446  
1447  
1448  
1449  
1450  
1451  
1452  
1453  
1454  
1455  
1456  
1457  
1458  
1459  
1460  
1461  
1462  
1463  
1464  
1465  
1466  
1467  
1468  
1469  
1470  
1471  
1472  
1473  
1474  
1475  
1476  
1477  
1478  
1479  
1480  
1481  
1482  
1483  
1484  
1485  
1486  
1487  
1488  
1489  
1490  
1491  
1492  
1493  
1494  
1495  
1496  
1497  
1498  
1499  
1500  
1501  
1502  
1503  
1504  
1505  
1506  
1507  
1508  
1509  
1510  
1511  
1512  
1513  
1514  
1515  
1516  
1517  
1518  
1519  
1520  
1521  
1522  
1523  
1524  
1525  
1526  
1527  
1528  
1529  
1530  
1531  
1532  
1533  
1534  
1535  
1536  
1537  
1538  
1539  
1540  
1541  
1542  
1543  
1544  
1545  
1546  
1547  
1548  
1549  
1550  
1551  
1552  
1553  
1554  
1555  
1556  
1557  
1558  
1559  
1560  
1561  
1562  
1563  
1564  
1565  
1566  
1567  
1568  
1569  
1570  
1571  
1572  
1573  
1574  
1575  
1576  
1577  
1578  
1579  
1580  
1581  
1582  
1583  
1584  
1585  
1586  
1587  
1588  
1589  
1590  
1591  
1592  
1593  
1594  
1595  
1596  
1597  
1598  
1599  
1600  
1601  
1602  
1603  
1604  
1605  
1606  
1607  
1608  
1609  
1610  
1611  
1612  
1613  
1614  
1615  
1616  
1617  
1618  
1619  
1620  
1621  
1622  
1623  
1624  
1625  
1626  
1627  
1628  
1629  
1630  
1631  
1632  
1633  
1634  
1635  
1636  
1637  
1638  
1639  
1640  
1641  
1642  
1643  
1644  
1645  
1646  
1647  
1648  
1649  
1650  
1651  
1652  
1653  
1654  
1655  
1656  
1657  
1658  
1659  
1660  
1661  
1662  
1663  
1664  
1665  
1666  
1667  
1668  
1669  
1670  
1671  
1672  
1673  
1674  
1675  
1676  
1677  
1678  
1679  
1680  
1681  
1682  
1683  
1684  
1685  
1686  
1687  
1688  
1689  
1690  
1691  
1692  
1693  
1694  
1695  
1696  
1697  
1698  
1699  
1700  
1701  
1702  
1703  
1704  
1705  
1706  
1707  
1708  
1709  
1710  
1711  
1712  
1713  
1714  
1715  
1716  
1717  
1718  
1719  
1720  
1721  
1722  
1723  
1724  
1725  
1726  
1727  
1728  
1729  
1730  
1731  
1732  
1733  
1734  
1735  
1736  
1737  
1738  
1739  
1740  
1741  
1742  
1743  
1744  
1745  
1746  
1747  
1748  
1749  
1750  
1751  
1752  
1753  
1754  
1755  
1756  
1757  
1758  
1759  
1760  
1761  
1762  
1763  
1764  
1765  
1766  
1767  
1768  
1769  
1770  
1771  
1772  
1773  
1774  
1775  
1776  
1777  
1778  
1779  
1780  
1781  
1782  
1783  
1784  
1785  
1786  
1787  
1788  
1789  
1790  
1791  
1792  
1793  
1794  
1795  
1796  
1797  
1798  
1799  
1800  
1801  
1802  
1803  
1804  
1805  
1806  
1807  
1808  
1809  
1810  
1811  
1812  
1813  
1814  
1815  
1816  
1817  
1818  
1819  
1820  
1821  
1822  
1823  
1824  
1825  
1826  
1827  
1828  
1829  
1830  
1831  
1832  
1833  
1834  
1835  
1836  
1837  
1838  
1839  
1840  
1841  
1842  
1843  
1844  
1845  
1846  
1847  
1848  
1849  
1850  
1851  
1852  
1853  
1854  
1855  
1856  
1857  
1858  
1859  
1860  
1861  
1862  
1863  
1864  
1865  
1866  
1867  
1868  
1869  
1870  
1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900  
1901  
1902  
1903  
1904  
1905  
1906  
1907  
1908  
1909  
1910  
1911  
1912  
1913  
1914  
1915  
1916  
1917  
1918  
1919  
1920  
1921  
1922  
1923  
1924  
1925  
1926  
1927  
1928  
1929  
1930  
1931  
1932  
1933  
1934  
1935  
1936  
1937  
1938  
1939  
1940  
1941  
1942  
1943  
1944  
1945  
1946  
1947  
1948  
1949  
1950  
1951  
1952  
1953  
1954  
1955  
1956  
1957  
1958  
1959  
1960  
1961  
1962  
1963  
1964  
1965  
1966  
1967  
1968  
1969  
1970  
1971  
1972  
1973  
1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030  
2031  
2032  
2033  
2034  
2035  
2036  
2037  
2038  
2039  
2040  
2041  
2042  
2043  
2044  
2045  
2046  
2047  
2048  
2049  
2050  
2051  
2052  
2053  
2054  
2055  
2056  
2057  
2058  
2059  
2060  
2061  
2062  
2063  
2064  
2065  
2066  
2067  
2068  
2069  
2070  
2071  
2072  
2073  
2074  
2075  
2076  
2077  
2078  
2079  
2080  
2081  
2082  
2083  
2084  
2085  
2086  
2087  
2088  
2089  
2090  
2091  
2092  
2093  
2094  
2095  
2096  
2097  
2098  
2099  
2100  
2101  
2102  
2103  
2104  
2105  
2106  
2107  
2108  
2109  
2110  
2111  
2112  
2113  
2114  
2115  
2116  
2117  
2118  
2119  
2120  
2121  
2122  
2123  
2124  
2125  
2126  
2127  
2128  
2129  
2130  
2131  
2132  
2133  
2134  
2135  
2136  
2137  
2138  
2139  
2140  
2141  
2142  
2143  
2144  
2145  
2146  
2147  
2148  
2149  
2150  
2151  
2152  
2153  
2154  
2155  
2156  
2157  
2158  
2159  
2160  
2161  
2162  
2163  
2164  
2165  
2166  
2167  
2168  
2169  
2170  
2171  
2172  
2173  
2174  
2175  
2176  
2177  
2178  
2179  
2180  
2181  
2182  
2183  
2184  
2185  
2186  
2187  
2188  
2189  
2190  
2191  
2192  
2193  
2194  
2195  
2196  
2197  
2198  
2199  
2200  
2201  
2202  
2203  
2204  
2205  
2206  
2207  
2208  
2209  
2210  
2211  
2212  
2213  
2214  
2215  
2216  
2217  
2218  
2219  
2220  
2221  
2222  
2223  
2224  
2225  
2226  
2227  
2228  
2229  
2230  
2231  
2232  
2233  
2234  
2235  
2236  
2237  
2238  
2239  
2240  
2241  
2242  
2243  
2244  
2245  
2246  
22